

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AC

(11)Publication number : 01-305036
(43)Date of publication of application : 08.12.1989

(51)Int.Cl. A61K 37/04
C07K 3/12
C07K 15/06

(21)Application number : 63-135281

(71)Applicant : GREEN CROSS CORP:THE

(22)Date of filing : 31.05.1988

(72)Inventor : TAKECHI KAZUO
IGA YOSHIRO

(54) HEAT-TREATMENT OF PLASMA PROTEIN COMPONENT AND DRUG PREPARATION CONTAINING PLASMA PROTEIN COMPONENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To essentially completely inactivate various viruses without causing much loss of physiological activity of a plasma protein component by heat- treating an aqueous solution containing a plasma protein component at a specific temperature for a specific period.

CONSTITUTION: An aqueous solution containing a plasma protein component such as coagulation factor, fibronectin, plasminogen, antithrombin III and albumin at a concentration of 0.1-30W/V%, preferably 1-10W/V% is heat-treated at 50-70° C for 15-30hr, preferably at 60° C for 20hr preferably in the presence of 10-200g of sugar (preferably mannitol, sorbitol or xylitol) as a stabilizer based on 100ml of the aqueous solution.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A) 平1-305036

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)12月8日

A 61 K 37/04
C 07 K 3/12
15/06

8615-4C

8318-4H 審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑭ 発明の名称 血漿蛋白成分の加熱処理方法および血漿蛋白成分製剤

⑮ 特 願 昭63-135281

⑯ 出 願 昭63(1988)5月31日

⑰ 発 明 者 武 智 和 男 大阪府枚方市招提大谷2-1180-1 株式会社ミドリ十字
中央研究所内⑱ 発 明 者 伊 賀 善 郎 大阪府枚方市招提大谷2-1180-1 株式会社ミドリ十字
中央研究所内

⑲ 出 願 人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市東区今橋1丁目15番地の1

⑳ 代 理 人 弁理士 高 島 一

明 細 書

1. 発明の名称

血漿蛋白成分の加熱処理方法および血漿蛋白成分製剤

2. 特許請求の範囲

(1) 血漿蛋白成分含有水溶液を50～70℃で15～30時間加熱処理することを特徴とする血漿蛋白成分の加熱処理方法。

(2) 少なくとも糖の存在下に加熱処理を行う請求項(1)記載の加熱処理方法。

(3) 血漿蛋白成分含有水溶液の状態において50～70℃で15～30時間加熱処理してなることを特徴とする血漿蛋白成分製剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、血漿蛋白成分の加熱処理方法および血漿蛋白成分製剤に関する。

(従来技術)

血漿蛋白成分を血漿分画から得る場合には、肝炎ウイルス等の夾雑ウイルスの混在を否定するこ

とができない。従って、血漿蛋白成分製剤は血液製剤化技術において、夾雑ウイルスの不活化方法として広く知られている60℃、10時間の液状加熱処理を施されていることが極めて重要である。

(発明が解決しようとする課題)

ところで本発明者らは、上記の60℃で10時間の条件下での加熱処理によってはウイルスの種類によっては充分に不活化できないのではないかと懸念を持っている。

そこで、本発明者らは血漿蛋白成分を殆ど不活化させることなく、夾雑ウイルスを実質的に不活化させることを目的として液状加熱処理条件について検討を重ねて来たところ、50～70℃で15～30時間という従来より過酷な加熱処理条件でも所期の目的が達成できることを見出した。

また、その際、少なくとも糖の存在下に加熱処理を行うことが、効果の発現に大いに寄与することを見出した。

本発明は以上の新知見に基づいて完成されたものである。

〔課題を解決するための手段〕

即ち、本発明は下記(1)～(3)に関するものである。

(1) 血漿蛋白成分含有水溶液を50～70℃で15～30時間加熱処理することを特徴とする血漿蛋白成分の加熱処理方法。

(2) 少なくとも糖の存在下に加熱処理を行う請求項(1)記載の加熱処理方法。

(3) 血漿蛋白成分含有水溶液の状態において50～70℃で15～30時間加熱処理してなることを特徴とする血漿蛋白成分製剤。

本発明の血漿蛋白成分はヒト血漿に由来するものであれば特に限定されない。具体的には、血液凝固因子(例えば、第Ⅶ因子、第Ⅸ因子、第Ⅹ因子複合体、第ⅩⅢ因子など)、フィブロンネクチン、プラスミノゲン、アンチトロンビンⅢ、アルブミン、ハプトグロビン、コロニー形成刺激因子などが挙げられる。

この血漿蛋白成分は未精製、部分精製、高度精製のいずれの段階にあってもよい。

また、水溶液中における血漿蛋白成分の含量と

しては、0.1～30w/v%、好ましくは1～10w/v%程度が例示される。当該水溶液のpHは一般に4～10であり、好ましくは適当な緩衝液によってpH6～8程度に調整される。

血漿蛋白成分含有水溶液を加熱処理する際には、従来公知の安定化剤を加えることが好ましい。安定化剤としては糖(単糖類、二糖類、糖アルコールなど)、アミノ酸、有機酸塩、無機塩、界面活性剤、アルブミンなどが挙げられ、これらは2種以上を併用してもよい。特に好ましい安定化剤は糖である。

単糖類としてはグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖などが、二糖類としてはショ糖、麦芽糖、乳糖などが、糖アルコールとしてはマンニット、ソルビット、キシリットなどが好適なものとして例示されるが、これらに限定されるものではない。糖類の添加量は、血漿蛋白成分含有水溶液100cc当たり10～200gである。

中性塩としては塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムなどのアルカ

リ金属またはアルカリ土類金属のハロゲン酸塩などが例示され、その添加量は、血漿蛋白成分含有水溶液100cc当たり0.1～10gである。

アミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、リジン、アルギニンなどが例示され、その添加量は血漿蛋白成分含有水溶液100cc当たり1～30gである。

有機酸としては、有機カルボン酸(炭化水素残基にカルボキシル基が置換したもの)であることが好ましく、炭化水素残基は飽和されていても不飽和であってもよく、また鎖状(直鎖状または分枝状)、環状のいずれでもよい。当該炭化水素残基としてはアルキル基、アリール基(たとえばフェニル基)などが例示される。当該有機酸におけるカルボキシル基は複数個であってもよいが、1または2個が好ましい。また当該有機酸は、水酸基で置換されていてもよい。有機酸塩における塩としては、生理的に許容されるものであれば特に制限はなく、好ましいものとしては、アルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩など)、アルカ

リ土類金属塩(カルシウム塩など)、特に好ましくは、ナトリウム塩、カリウム塩が挙げられる。

かかる有機酸の好ましい炭素数は、3～15程度である。

有機酸塩の具体例としては、プロパン酸、ブタン酸、ペンタン酸、カプリン酸、カプロン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、クエン酸、マンデル酸などの生理的に許容される塩、特にアルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩)が挙げられる。

有機カルボン酸塩の添加量は、血漿蛋白成分含有水溶液100cc当たり1～30gである。

界面活性剤としては、アルキルフェニルポリオキシエチレン(たとえば、トリトン(Triton®)、ノニデット(Nonidet®))のような非イオン性剤、胆汁酸塩(例えばナトリウムタウロコラート)のようなアニオン性剤、またベンズアルコニウムクロライドのようなカチオン性剤、プロピレンオキシドの高分子量共重合体のような界面活性を持つ多価アルコール(プルロニック(Pluronic®)F

68)などが例示され、その添加量は、当該水溶液100ml当たり0.002~0.05g程度が好ましい。アルブミンはヒト血清由来または遺伝子組換えによって得られたものが好ましい。添加量としては当該水溶液100ml当たり0.1~10g程度が好ましい。

加熱処理は、50℃~70℃、好ましくは約60℃にて15~30時間、好ましくは20時間行われる。

かくして得られた製剤は溶液状であり、高度精製血漿蛋白成分を出発材料とした場合はそのまま、粗製品を用いた場合は公知の精製法に準じて処理を行った後、必要ならば、透析、除菌濾過を行った後、包装単位に従って分注されて、その貯蔵方法は、高温を避ければ特に限定されるものではないが、30℃以下に保存することが好ましい。また、当該血漿蛋白成分製剤は所望により凍結乾燥製剤としてもよい。

当該処理を経た血漿蛋白成分は、そのまま、または自体公知の製剤化処理を行って、たとえば注

射用蒸留水で溶解または希釈して投与される。投与量は各々の血漿蛋白成分が通常用いられる量である。

(効果)

本発明によれば、血漿蛋白成分の生理活性をあまり損失することなく、各種ウィルスを実質的に完全に不活性化できる。

従って、本発明により得られた血漿蛋白成分製剤は、医療上極めて安全性が高く、また有効性にも優れたものと言える。

(実施例)

本発明をより詳細に説明するために実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

実施例1(血液凝固第Ⅷ因子)

部分精製した第Ⅷ因子溶液1mlにショ糖2.0gを加え、37℃に加温して溶解させる。この溶液をpH7.0に調整したのち、60℃の温浴中で20時間加熱する。次に限外濾過装置を用いてショ糖を除去し、第Ⅷ因子を濃縮する。第Ⅷ因子の活性

残存率は56%であった。

実施例2(血液凝固第Ⅷ因子)

クリオプレシビタイトの抽出液1mlにソルビトール2.0gを加え、37℃の温浴中で加温して溶解させる。この溶液をpH7.0に調整したのち、60℃の温浴中で20時間加熱する。次に限外濾過装置を用いてソルビトールを除去し、第Ⅷ因子を濃縮する。第Ⅷ因子の活性残存率は58%であった。

実施例3(血液凝固第Ⅸ因子複合体)

正常人血漿からコーンの冷エタノール分画法により得られた第Ⅸ分画を用いて、DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー法(ダイク、ジー、ダブル、アールら、ブリティッシュジャーナルオブヘマトロジー(Dike, G.W.R., et al., British Journal of Haematology), 第22巻、第469頁(1972))により第Ⅸ因子含有粉末品(1mg蛋白当たりの第Ⅸ因子活性15単位)を調製した。この第Ⅸ因子含有製剤100gを6.5lの水で溶解した後、ショ糖(1g/ml)、グリシン(2.2M)および塩化カルシウム(0.5

M)を添加した。この第Ⅸ因子含有製剤溶液のpHを7.6に調整後、50ml容バイアル瓶に20mlずつ小分け分注した後、60℃で20時間加熱処理した。

実施例4(血液凝固第ⅩⅢ因子)

pH7.0の0.05Mリン酸緩衝液に溶解した活性100単位/mlの第ⅩⅢ因子を含有する水溶液1lにマンニトール150g、カプリル酸ナトリウム150gを添加した。これをよく攪拌した後、60℃で20時間加熱する。冷却後、沈澱を回収し、再びpH7.0の0.05Mリン酸緩衝液に溶解した。この溶解液をpH7.2の0.005MEDTA含有0.05Mリン酸緩衝液に対して透析して澄明な液を得る。この液に上記と同様の緩衝液であらかじめ平衡としたQAE・セファデックスを湿重量で500g加えて第ⅩⅢ因子を吸着させ、これから0.5Mの塩化ナトリウムで溶出されてくる画分を集めて、2.25%グリシンを加えた0.5%塩化ナトリウム溶液に対して透析し、除菌濾過、分注後凍結乾燥する(加熱処理時の活性残存率は90

%)。

実施例5 (フィブロネクチン)

ブールした正常成人血漿よりコーンのエタノール分画によって得られる第I画分を0.055 M クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 に溶解し、これに0.01 M のイブシロンアミノカプロン酸およびアプロチニン10単位/μlを加え、更にリジンセファロースによりプラスミンおよびプラスミノゲンを除去したのち、ヘパリン10単位/μlを加えて0~2℃に48時間静置して沈澱を集める。沈澱は0.05 M リン酸緩衝液、pH 6.0 と1 M グリシンおよび6.5%エタノールを含む0.055 M クエン酸緩衝液とでそれぞれ洗浄したのち、0.055 M クエン酸緩衝液、pH 6.35 を加えて室温にもたらし、沈澱を溶解させる。これを0~2℃に放置後沈澱を分けとりCIG (フィブロネクチン) を含有する画分クライオフィブリノゲンを得る。

クライオフィブリノゲン(沈澱)を、0.05 M トリスーリン酸緩衝液、pH 7.0 に溶解し、これを同一緩衝液で平衡化したDEAEセファデック

ーゲンを吸着させ、次いで生理食塩溶液で洗浄した後、0.25 M リジンと0.9%グリシンとを含む溶媒(pH 7.2)を用いて吸着したプラスミノゲンを溶出せしめた。

この精製プラスミノゲン液1μlにショ糖1gおよびアプロチニン50 KIUを加え、60℃、20時間加熱処理を行い、残存プラスミノゲンの力価を求めた。

プラスミノゲンの力価は、Friberger らの方法 (Churchill Livingston, 128, 1979) に準じ発色合成基質S-2251を用いて測定した。その結果、92%の残存率を示した。

実施例7 (アンチトロンビン-III)

コーンの冷アルコール分画法で得られた画分IV-1のペースト10kgを生理食塩水100ℓに懸濁し、硫酸バリウムを5w/v%になるように加え、室温で30分間攪拌した。この上清液をpH 6.5に調整し、ポリエチレングリコール#4000を13w/v%になるように加え、生じた沈澱を遠心分離して除き、さらにポリエチレングリコール#4000

スに吸着させ、同一緩衝液および0.09 M トリスーリン酸緩衝液、pH 7.0 で洗浄したのち、0.2 M トリスーリン酸緩衝液、pH 7.0 でCIGの溶出を行う。

0.05 M トリスーリン酸緩衝液、pH 8.0 に溶解した30mg/μlのCIGを含有する水溶液1ℓにショ糖1kgを添加した。これをよく攪拌した後、60℃で20時間加熱した。冷却後、0.9%塩化ナトリウム溶液に対して透析し、遠心分離して澄明な液を得た。

このようにして得られたCIGにつき一元免疫拡散法でCIGを定量したところ、CIGの回収率は79%であった。

実施例6 (プラスミノーゲン)

コーンの冷エタノール分画法で得られた画分II+IIIを1w/v%塩化ナトリウム、1w/v%グリシン溶液に懸濁し、攪拌後、遠心分離により上澄を分離した。この上澄を Deutsch, D. G. ら (Science, 170, 1095, (1970)) の方法に準じ、リジンセファロースカラムに注入し、プラスミノ

を30w/v%になるように加え、生じた沈澱を遠心分離して回収した。この沈澱を冷生理食塩水約20ℓに溶解し、予め生理食塩水で調製されたヘパリンセファロースのカラムへ注入し、アンチトロンビン-IIIをカラムに吸着させた。このカラムを0.4 M の塩化ナトリウム溶液で洗浄したのち、2.0 M の塩化ナトリウム溶液をカラムに流して溶出部分を回収した。

このアンチトロンビン-IIIの水溶液にショ糖(溶液1μl当たり1g)およびグリシン(溶液1μl当たり0.3g)を加え、pH 7.8に調整した後60℃で20時間の加熱処理を施し、続いて0.9%塩化ナトリウム溶液に対し1夜透析を行いつつ濃縮してアンチトロンビン-IIIの1w/v%水溶液を得、必要に応じて濾過または遠心分離を行って澄明な液とした。

このアンチトロンビン-IIIの1w/v%水溶液にマニトール2w/v%とクエン酸ナトリウム0.2w/v%を加え、塩化ナトリウムが0.5%になるように少量の冷蒸留水を希釈し、1 N の水酸化

ナトリウムでpH7.6に調整した後、減圧したミリポアフィルターで除菌濾過し、500単位ずつ分注し、凍結乾燥を行って乾燥製剤とした。

実施例8 (アルブミン)

正常人血漿からコーンの冷エタノール分画法により得られた第V画分を精製して純度96%以上のアルブミン画分を得た。これをアルブミン濃度5w/v%溶液に調整した後、60℃で20時間加熱処理した。

実施例9 (ハプトグロビン)

人血漿よりコーンの低温エタノール分画法で得た画分IV30kgにpH8.2の0.05モル酢酸アンモニウム緩衝液145ℓを加え懸濁した。これに1%リパノール水溶液120ℓを加え3時間かきまぜ、2時間静置後、沈澱を分離し、得られた上清液に8kgの酸性白土を加えて2時間攪拌後濾過して澄明な濾液を得た。濾液に1N酢酸を加えてpHを7.0とした後、硫酸アンモニウムを30%飽和となるまで加え、生じた沈澱を除去後、硫酸アンモニウムを追加して40%飽和とじて、生じた沈

澱を採取した。得られた沈澱を0.05M酢酸ナトリウム溶液10ℓに溶解し(ハプトグロビンとして4%)これに20%(w/v)となるようにマニトールを加え、温浴中60℃で20時間の加熱処理を施した。加熱処理した液は0.05モルの酢酸緩衝液(pH5.0)に対し、透析した後200gのQAE-セファデックスA-50をあらかじめ同一液で平衡化したものと混じ、ハプトグロビンを吸着させた。ハプトグロビンを吸着した上記QAE-セファデックスA-50をイオン強度0.05の緩衝液(組成:0.05M酢酸、0.05M酢酸ナトリウム3水和物)で洗った後、イオン強度0.3の緩衝液(組成:0.3M酢酸+0.3M塩化ナトリウム)で洗い、ハプトグロビンを溶離した。溶離液に硫酸アンモニウムを加えて50%飽和として生じた沈澱を濾取し、得られた沈澱を生理食塩水1.5ℓに溶解し透析後0.2μのミリポアフィルターで除菌濾過してハプトグロビン水溶液を得た。

加熱処理前後でハプトグロビンの機能を示すヘモグロビン結合能を測定したところ、残存率は85

%であった。

実験例1 (安定化効果)

(1) 血液凝固第VII因子の場合

実施例2に準じて60℃、30時間の液状加熱処理を行い、加熱前の第VII因子活性(VII:c)を100とした時の加熱後残存活性率(%)を経時的に求めた。第VII因子活性は活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)により測定した。結果を第1表に示す。

第1表

	活性残存率(%)
加熱前	100
60℃10時間	85
同20時間	66
同30時間	58

(2) 血液凝固第IX因子(複合体)の場合

実施例3に準じて60℃、25時間の液状加熱

処理を行い、加熱前の第IX因子活性を100とした時の加熱後残存活性率(%)を経時的に求めた。第IX因子活性は一段法による凝血測定法(New Engl. Med., 257, 125-130 (1952))により測定した。結果を第2表に示す。

第2表

	残存活性率(%)
加熱前	100
60℃5時間	81
同10時間	77
同20時間	72
同30時間	64

実験例2 (ウィルス不活化効果)

(1) 血液凝固第VII因子の場合

実施例2に準じて調整した第VII因子含有水溶液に第3表に記載のウィルスを懸濁させた50mMリン緩衝液(pH7)を添加した。

60℃で20時間液状加熱処理を行い、経時的に残存する各ウイルスの感染性をブランク形成法により測定した。結果を第3表に示す。

(以下余白)

第3表

ウイルス	ウイルス感染性*			
	加熱前	60℃5時間	同10時間	同20時間
ベシキュラー	5.0×10^4	— [†]	—	—
ストマチチチスウイルス	5.0×10^4	—	—	—
チクングニアウイルス	6.3×10^4	—	—	—
シンドリビスウイルス	1.0×10^5	1.8×10^5	—	—
ヘルペス	2.5×10^5	—	—	—
シンプレックスウイルス	—	—	—	—
ワクチニアウイルス	1.0×10^5	—	—	—
エコーウイルス	$10^{5.5}$	$< 10^{2.5}$	$< 10^{1.5}$	$< 10^{0.5}$

* エコーウイルス以外の単位はpfu/ml

エコーウイルスの単位はTCID₅₀/ml

† は50 pfu/ml以下

(2) 血液凝固第Ⅸ因子の場合

実施例3に準じて調製した第Ⅸ因子含有水溶液に第4表に記載のウイルスを懸濁させた50mMリン酸緩衝液(pH7)を添加した。

60℃で20時間液状加熱処理を行い、経時的に残存する各ウイルスの感染性をブランク形成法により測定した。結果を第4表に示す。

(以下余白)

第4表

ウイルス	ウイルス感染性*			
	加熱前	60℃5時間	同10時間	同20時間
シンドリビスウイルス	3.5×10^5	< 500	< 500	< 500
ムンアスウイルス	6.8×10^4	— [†]	—	—
ヘルペス	2.8×10^5	—	—	—
シンプレックスウイルス	3.2×10^5	—	—	—
ベシキュラー	—	—	—	—
ストマチチチスウイルス	9.7×10^5	—	—	—
チクングニアウイルス	1.2×10^5	—	—	—
ワクチニアウイルス	$10^{5.5}$	$< 10^{2.5}$	$< 10^{1.5}$	$< 10^{0.5}$

* エコーウイルス以外の単位はpfu/ml

エコーウイルスの単位はTCID₅₀/ml

† は50 pfu/ml以下



特許出願人 株式会社 三井物産
代理人 弁理士 高島